

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21720091152195

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

大肠杆菌中 RIP3 的表达纯化及初步研究

Expression Purification and Primary Characterization of

RIP3 in *E. coli*

易自平

指导教师姓名: 韩家淮 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2012 年 5 月

论文答辩时间: 2012 年 6 月

学位授予日期:

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2012 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

细胞凋亡和坏死长期被认为是高等生物正常生长发育的关键因素。受体相互作用蛋白 3 (RIP3) 参与了细胞凋亡信号通路的调节, 并且近期研究表明 RIP3 作为细胞凋亡和坏死之间转换的分子开关, 能够激活线粒体关键代谢酶导致 ROS 的产生, 在介导细胞坏死调控中起关键作用。此外 RIP3 参与的细胞坏死反应可作为细胞死亡的备份方式, 在细胞凋亡方式被抑制后启动细胞坏死清除入侵病毒, 在细胞免疫中发挥重要作用。在细胞死亡信号调节中, RIP3 如何协同其他调控蛋白实现其细胞功能, RIP3 各个结构域如何实现功能, 以及 RIP3 如何识别并作用于下游蛋白如 MLKL, 都是亟待解决的问题。而体外获得高质量 RIP3 是解决问题的关键点之一, 同时也为 RIP3 及其家族结构研究和药物设计打下基础。因此我们利用原核表达方式纯化了 RIP3 激酶结构域并对其活性进行初步探索。首先利用软件对 RIP3 进行蛋白序列以及功能域相关分析, 并结合全长 RIP3 基因在大肠杆菌中初始表达纯化情况, 设计了一个由不同长度 RIP3 激酶结构域组成的蛋白表达筛选库。通过表达筛选得到微量可溶性表达 RIP3 激酶结构域的克隆。在此基础上, 通过对蛋白表达过程优化、表达菌株的选择、纯化条件的摸索以及利用亲和层析-离子交换两步纯化法得到了毫克级高纯度 RIP3 激酶结构域。利用色谱技术分析指出了体外条件下 RIP3 激酶结构域聚集体状态。最后通过对溶液中蛋白状态的影响因素进行调整优化, 我们发现了 RIP3 激酶结构域在溶液中的聚集状态会随溶液条件变化, 进而影响其活性。

关键词: 受体相互作用蛋白 3; 蛋白表达; 序列分析

Abstract

Apoptosis and necrosis have long been considered key factors in normal development of higher organisms. Receptor-interacting protein 3 (RIP3) is involved in apoptosis signaling pathway. Recent studies have found that RIP3 functions as a molecular switch between apoptosis and necrosis and can activate key metabolic enzymes in mitochondrion to produce ROS, playing a key role in promote cell necrosis. Besides, RIP3 involved necrosis serves as a backup of cell death and can launch to clear intruding viruses when cell apoptosis is inhibited, playing an important role in cell immunity. In the regulation of cell death, questions, such as how RIP3 collaborates with other regulatory proteins to achieve its cellular functions, how the individual domains of RIP3 function, as well as how RIP3 recognize its downstream substrate such as MLKL, are to be solved. Acquiring high quality RIP3 *in vitro* is key to answer these questions, as well as investigation of protein structure and drug design of RIP3 and its family. Therefore, we adopted prokaryotic protein expression system, successfully purified RIP3 kinase domain, and carried out primary analysis on its activity. First, RIP3 protein sequence and domain was analyzed *in silico*. Combined with expression result of full-length RIP3 in *E. coli* in initial trial, an expression screening library of RIP3 kinase domain of various length was designed. Construct of trace soluble expression of RIP3 kinase domain was identified by expression screening. Further protein expression process, expression strain and purification conditions were optimized. Through affinity chromatography-ion exchange two-step purification, milligrams of high purity RIP3 was available. Size exclusion chromatography analysis indicated the possible aggregate state of RIP3. Finally, through adjusting key factors that influence protein state in solution, we found that the aggregate state of RIP3 kinase domain varied with buffer conditions, further influencing its kinase activity.

Keywords: receptor-interacting protein 3; protein expression; sequence analysis.

目录

中文摘要	I
英文摘要	II
第一章 前言	1
1.1 RIP3 蛋白简介	1
1.1.1 RIP3 所属家族-RIP 家族	1
1.1.2 RIP3 剪切异构体	2
1.1.3 RIP3 主要结构域	2
1.1.4 RIP3 细胞定位	3
1.2 RIP3 重要生物学功能	4
1.2.1 RIP3 和细胞凋亡	4
1.2.2 RIP3 和细胞坏死	6
1.2.3 RIP3 与 NF- κ B 信号通路	6
1.3 大肠杆菌重组蛋白表达方法	8
1.3.1 大肠杆菌表达系统原理	8
1.3.2 大肠杆菌表达系统高效表达策略	10
1.3.3 大肠杆菌表达系统特点	13
第二章 材料与方法	15
2.1 试验材料	15
2.2 实验主要仪器	16
2.3 DNA 相关实验和方法	16
2.3.1 质粒载体	16
2.3.2 大肠杆菌感受态细胞的制备和转化	18
2.3.3 质粒 DNA 的提取	19
2.3.4 DNA 的限制性内切酶消化	20
2.3.5 DNA 的回收和纯化	21
2.3.6 DNA 连接酶非依赖性连接反应	23

2.3.7 PCR 反应	24
2.4 蛋白相关实验方法	25
2.4.1 常用试剂的配制	25
2.4.2 蛋白质定量方法 (Bradford 法)	29
2.4.3 蛋白的表达和纯化	30
2.4.4 层析方法分析纯化蛋白	32
2.4.5 激酶活性实验	34
第三章 结果与分析	35
3.1 RIP3 初步表达实验	35
3.1.1 RIP3 表达克隆构建	35
3.1.2 RIP3 表达的初步分析	36
3.2 RIP3 基于蛋白表达的序列分析	37
3.2.1 RIP3 总体结构分析	37
3.2.2 .RIP3 C 端二级结构分析	39
3.3.RIP3 激酶结构域边界确定	40
3.3.1 GST 标签 RIP3 激酶结构域表达	40
3.3.2 计算机分析 RIP3 激酶结构域	40
3.3.3 小规模蛋白表达试验	42
3.4 RIP3 表达优化	43
3.4.1 优化表达温度	43
3.4.2 优化 IPTG 诱导	43
3.4.3 表达菌株选择	44
3.5 RIP3 的纯化	45
3.5.1 pH 对 RIP3 纯化的影响	45
3.5.2 离子交换纯化 RIP3	46
3.6 RIP3 活性研究	46
3.6.1 RIP3 激酶活性测定	46
3.6.2 色谱层析分析 RIP3 构象	48
3.6.3 蛋白缓冲液对 RIP3 活性的影响	49

3.7 总结与分析	53
附录 1 缩略词及中英文对照	55
附录 2 图表索引	57
参考文献	58

厦门大学博硕士论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese	III
Abstract in English	IV
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Introduction of RIP3 protein	1
1.1.1 RIP3 and RIP family	1
1.1.2 Splice variant of RIP3	2
1.1.3 Key domain of RIP3	2
1.1.4 Cellular location of RIP3	3
1.2 Biological function of RIP3	4
1.2.1 RIP3 and apoptosis	4
1.2.2 RIP3 and necrosis	6
1.2.3 RIP3 and NF- κ B signal pathway	6
1.2.2.1 RIP3 inhibit NF- κ B activation	6
1.2.2.2 Overexpression of RIP3 induces NF- κ B activation	7
1.3 E. coli protein expression system	8
1.3.1 Principle of E. coli protein expression system	8
1.3.1.1 Operon	8
1.3.1.2 Stringent control	9
1.3.2 Strategies for efficient protein production in E.coli	10
1.3.2.1 Construction of expression plasmid	10
1.3.2.2 Culture condition	11
1.3.2.3 Expression strain	12
1.3.2.4 protein sequence	13
1.3.3 Characteristics of E.coli expression system	13
1.3.3.1 Advantage of E.coli expression system	13
1.3.3.2 Disadvantage of E.coli expression system	14

Chapter 2 Materials and methods	15
2.1 Drugs and reagents	15
2.2 Instruments	16
2.3 Experiments and methods for DNA	16
2.3.1 Vector	16
2.3.1.1 pET28a vector	16
2.3.1.2 pGEX4T1vector	17
2.3.2 Preparation of competent cells and transformation	18
2.3.2.1 Preparation of competent cells	18
2.3.2.2 Transformation of DNA into competent cells	19
2.3.3 Preparation of plasmid DNA	19
2.3.3.1 Mini-prep of plasmid DNA by boiling	19
2.3.3.2 Midi-prep of plasmid DNA by alkaline lysis	20
2.3.4 Enzymatic treatments of plasmid DNA	20
2.3.5 Recovery and purification of DNA	21
2.3.5.1 Agarose gel electrophoresis	21
2.3.5.2 Recovery of DNA from agarose gel	22
2.3.6 Ligase independent ligation	23
2.3.7 PCR reaction	24
2.4 Experiments and methods for protein	25
2.4.1 Preparation of solutions	25
2.4.1.1 Preparation of culture medium	25
2.4.1.2 Preparation of antibiotics and IPTG solutions	26
2.4.1.3 Preparation of solutions for protein electrophoresis	26
2.4.1.4 Preparation of solutions for protein purification	27
2.4.2 Protein concentration determination(Bradford method)	29
2.4.3 protein expression and purification	30
2.4.3.1 Transformation of BL21(de3)	30
2.4.3.2 Expression and purification of recombinant protein	30

2.4.4 Protein purification and analysis by chromatography	32
2.4.5 Kinase assay	34
Chapter 3 Results and analysis	35
3.1 Initial trial of RIP3 expression	35
3.1.1 Construction of RIP3 expression plasmid	35
3.1.2 RIP3 expression	36
3.2 Analysis of sequence of RIP3 for protein expression	37
3.2.1 Analysis of overall structure of RIP3	37
3.2.2 Analysis of RIP3 C-terminal	39
3.3 RIP3 kinase domain boundary determination	40
3.3.1 GST-RIP3 kinase domain expression	40
3.3.2 Analysis of RIP3 kinase domain <i>in silico</i>	40
3.3.3 Small scale expression screening	42
3.4 Optimization of RIP3 expression	43
3.4.1 Optimization of induction temperature	43
3.4.2 Optimization of IPTG dose	43
3.4.3 Optimization of expression strain	44
3.5 Purification of RIP3	45
3.5.1 pH on RIP3 purification	45
3.5.2 RIP3 purification by ion exchange	46
3.6 Investigation of RIP3 activity	46
3.6.1 RIP3 kinase assay	46
3.6.2 RIP3 analysis by chromatography	48
3.6.3 Buffer component on RIP3 activity	49
3.7 Conclusion and discussion	53
Appendix 1 Abbreviations	55
Appendix 2 Index of Figures and tables	57
Reference	58

第一章 前言

1.1 RIP3 蛋白简介

1.1.1 RIP3 所属家族-RIP 家族

受体相互作用蛋白家族（receptor-interacting protein family, RIPs）为一类具有特异的丝氨酸（Serine）/苏氨酸（Threonine）蛋白激酶。在结构上，RIP 家族成员的特点是都具有一段同源性较高的保守激酶结构域。并且有着相似的生理功能，参与介导胁迫因子改变时发生的细胞信号转导级联反应。并且根据细胞的生理状态的不同，RIP 家族中的不同蛋白介导不同信号通路的信号转导，有的有利于细胞存活，有的则诱导细胞死亡反应。总之，RIP 家族是一类调节细胞死亡或者存活的重要分子。

RIP 家族蛋白从结构域组成上看，包含许多不同的结构域，如 RIP1 和 RIP2 含有 DD、CARD 等参与细胞凋亡结构域，RIP6 和 RIP7 含有 LRR 和 Roc/COR 结构域。LRR 结构域参与蛋白之间相互作用。并且激酶结构域分布位置也不同，RIP1-5 的激酶结构域在 N 端，而 RIP6 和 RIP7 的激酶结构域在中间。相同之处在于，结构上都具有一段同源性较高的 Ser/Thr 特异的蛋白激酶结。

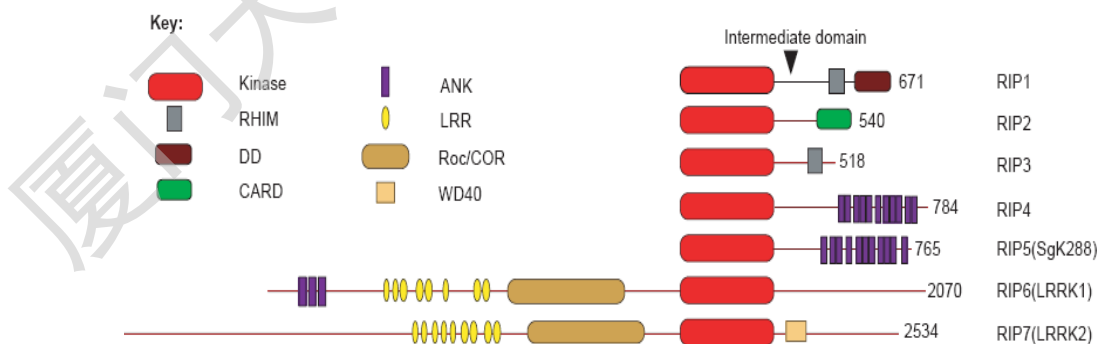


图 1.1 RIP 家族成员结构^[1]

Fig. 1.1 Domain organization of RIP kinase family

1.1.2 RIP3 剪切异构体

随着对研究 RIP3 的深入, Yang Y 等人发现, 除了 RIP3 本身之外, 在细胞内存在另外两种形式的 RIP3: RIP3 β 和 RIP3 γ ^[2], 它们源自不同的剪接方式。区别于全长 RIP3, 这两个剪切体均无完整的 N 末端激酶结构域, C 末端比正常 RIP3 短, 不具激酶活性, 亦缺乏核质穿梭及诱导凋亡能力^[2]。

研究发现 RIP3 β 和 RIP3 γ 能下调 RIP3 诱导的细胞凋亡。瞬时共转实验发现, 发现 RIP3 β 和 RIP3 γ 不仅不能诱导细胞凋亡, 还使得 RIP3 诱导的细胞凋亡下调了近一半。目前尚不了解这两个剪切体的具体功能, 不过相信对它们的研究将有助于进一步深入了解 RIP3 的生物学功能。

实时定量 PCR 分析结果显示, 与正常的组织相比, RIP3 γ 对 RIP3 的比例在结肠癌和肺癌细胞中明显升高, RIP3 γ 诱导细胞凋亡能力的缺失与肿瘤的发生可能存在重要的关联^[2]。

1.1.3 RIP3 主要结构域

RIP 家族属于 TKL 苏氨酸/丝氨酸蛋白激酶家族, 蛋白激酶结构域也是该家族所唯一共有结构域。RIP3 含有两个结构域, N 端激酶结构域和 C 端 RHIM 结构域。RIP3 的蛋白激酶结构域位于序列的 N 端大约氨基酸 22-292, 通过序列比对发现 RIP3 激酶结构域与家族的其他成员激酶结构域有高度保守性, 约有 30% 相同氨基酸、60% 相似性氨基酸。

体外激酶分析实验表明, RIP3 是一个激酶并且会发生自磷酸化^[3]。通过定点突变人源 RIP3 K51 位点可以失活 RIP3 激酶活性^[4], 鼠源 RIP3 的激酶活性中心位点为 Lys45^[5]。但 RIP3 的激酶活性不是其促细胞凋亡作用所必需的, 突变失活的 RIP3 并不影响其通过 TNF 信号通路促进 MCF7 细胞凋亡^[3]。RIP3 在 TNF-R1 以及 TRIF 通路中均参与 NF- κ B 的激活^[6]。通过基因敲除 RIP3, 小鼠胸腺内的 TNF 以及 TLR2 介导的 NF- κ B 的激活并没有下调, 即此条件下 NF- κ B 激活并不依赖 RIP3。相反, RIP3 通过 C 端 RHIM 结构域与 RIP1 结合, 促使其磷酸化, 在此过程中 RIP3 活性及 RHIM 结构域都是必须的。

RHIM (Receptor Homotypic Interacting Motif) 是在 RIP 家族中被发现而命名, 但在其他蛋白家族中广泛存在。如参与细胞免疫的蛋白 DAI, 以及在

LPS-TRL4 中起作用的 TRIF 蛋白，此外，在细胞巨化病毒也发现含有 RHIM 结构域的 M45 蛋白。M45 与 RIP1 和 RIP3 之间通过 RHIM 相互作用^[7]，并且，通过 M45 与 RIP1 的这种作用可以抑制细胞死亡，其背后的生物学意义在于在小鼠感染细胞巨化病毒后可以防止病毒成熟前细胞死亡。关于 RIP3 的 RHIM 首先是由 Sun 等人鉴定出来。通过 RIP3 缺失突变以及丙氨酸突变鉴定出 RIP3 RHIM 最小功能区为 442-472^[8]。通过 RHIM 结构域，RIP3 可以和 RIP1 形成符合物，通过形成符合物以及磷酸化反应，并促经 TNF 诱导的细胞坏死^[9]。RHIM 在 RIP3 和 RIP1 形成复合物中起什么作用，目前的生化研究数据尚不多，Sun 等人通过体外原核表达 RIP1 和 RIP3 来验证 RIP3 和 RIP1 的相互作用。结果表明 RIP1 和 RIP3 的相互作用，不仅依赖 RHIM 核心结构域，两端序列也起辅助作用^[3]。另外 Jeong 等人通过使用 GST 标签在细菌里表达 RIP3RHIM 结构域的一个 82 个氨基酸片段，经过圆二色谱、荧光色谱，表明 RIP3RHIM 呈 α 螺旋构像，并且呈现出温度依赖性构象转化^[10]，深入了解 RHIM 的结构信息有助于揭开 RIP3 和 RIP1 等含有 RHIM 结构域的蛋白的功能。

1.1.4 RIP3 细胞定位

关于 RIP3 在细胞内的定位至今仍未有统一观点。Yang Y 等人在 HeLa 细胞中过量表达 RIP3，鉴定出 RIP3 的细胞定位序列。在 RIP3 序列上，有一段非经典的核定位信号（nuclear localization signal, NLS）三段富含亮氨酸的核输出信号（nuclear export signal, NES），分别为 NLS（氨基酸 442-472）、NES1（氨基酸 255-264）、NES2（氨基酸 344-354）、NES3 I（氨基酸 116-126）和 NES3 II（氨基酸 121-131）。RIP3 定位于细胞质，可以通过核定位信号和核输出信号实现在细胞质和核之间穿梭^[11]。

此外，他们还在发现了 RIP3 的另一种依赖出核介导物 CRM1（chromosome region maintenance 1）核质定位方式：在 RIP3 上存在一段非经典的核定位信号，它和核输出序列 NES1 和 NES2 以 CRM1 依赖的方式介导 RIP3 出核。通过 CRM1 与出核蛋白上的 NES 序列结合可将其转运至核孔的出核部位；这种 CRM1 依赖出核方式在 NES1 和 NES2 中存在，NES 则不需要 CRM1 协助。氨基酸 260-268 和 339-349 为 NES1 和 NES2 在鼠源 RIP3 内的同源序列^[11]。

RIP3 的依赖 CRM1 的出核方式通过出核抑制剂 Leptomycin B (LMB) 得到证明。LMB 是从链霉菌中分离出来的一种不饱和支链脂肪酸, 末端带有内酯环, 可以和 CRM1 的一个保守半胱氨酸巯基形成共价化合物, 阻止 CRM1 和出核目标蛋白的 NES 序列相互作用, 是一种有效的 CRM1 介导的出核转运的抑制剂^[12, 13]。Hela 细胞中外源表达的 RIP3 在 LMB 处理后, 大多定位于细胞核内, 说明 RIP3 主要的核输出方式是 CRM1 依赖的, 即通过 NES1 和 NES2 实现核质间的自由穿梭^[11]

Gary M 等人报道则不同, 他们认为 RIP3 以点状形式定位于线粒体^[14]。他们通过外源表达的 RIP3 或 RIP1, 在细胞内都定位于线粒体, 并由此推测二者可能在线粒体存在相互作用。同时作者还利用特异性抑制剂 Z-DEVD-FMK (抑制 caspase-3、-6、-7、-8、-10) 和 caspase 的广谱性抑制剂 zVAD, 推测 RIP3 作用于线粒体上游以激活 caspase, 并且认为可能 RIP3 与 RAIDD 蛋白的功能类似, 在线粒体上激活 caspase-2, 而不是在 TNF-R1 信号复合体中激活 caspase^[14, 15]。

通过外源表达 RIP3 的 NLS 氨基酸 (442-472) 可以诱导细胞凋亡, Yang Y 等人据此推断核定位与 RIP3 诱导细胞凋亡有关^[11]。这与之前关于 TRADD 和 FADD 能在细胞核内诱导细胞凋亡^[16-18]报道类似。此外 p53 和 APC (adenomatous polyposis coli) 等抑癌因子功能也受到自身核质穿梭能力的调节^[19, 20]。此外, Sun X 等人指出外源 RIP3 在 TNF 刺激下与内源 RIP1 共定位于 TNF-R1 信号符合物上, 并且通过磷酸化 RIP1 调控 NF- κ B 活化^[8]。

综上所述, RIP3 的定位还需要通过进一步研究确定, 不过可以肯定 RIP3 的亚细胞定位与其所执行的功能密切相关。

1.2 RIP3 重要生物学功能

1.2.1 RIP3 和细胞凋亡

RIP3 广泛表达于胚胎和大量的成熟组织中。它所定位的染色体区域是肿瘤发生中多发基因突变的区域, 提示 RIP3 对肿瘤的形成或存活有着重要的影响^[14]。且有实验表明在 23 种癌细胞系里检测不到 RIP3 的表达^[14]。

RIP3 很早被鉴定出过量表达会诱导细胞凋亡的蛋白激酶^[5,6,21]。在 HeLa 细胞、Phoenix-A 细胞（一株包装逆转录病毒的 293T 细胞）、MCF-7 乳腺癌细胞（breast carcinoma cells）和 293E 肾上皮细胞（293E renal epithelial cells）中过量表达 RIP3，会引起细胞死亡。并且形态学特征与细胞凋亡一致，同时检 caspase 也会被激活，即过量表达 RIP3 能引起 caspase 依赖的细胞凋亡^[3]。通过实验进一步发现，该细胞凋亡的发生依赖于 RIP3 的 C 末端，但其激酶活性区以及 RIP3 与 RIP1 相互作用的 RHIM 结构域^[5,14]不是必须的。

用 TNF 处理过量表达 RIP3 的细胞后，发现 C 末端缺失的 RIP3 能够抑制 TNF 诱导的 caspase 的激活，但不影响 TNF 引发的 NF- κ B 信号通路，即 RIP3 的 C 末端可能在 TNF 诱导的 caspase 依赖的细胞凋亡途径中发挥着重要的功能^[3]。

RIP1 在 TNF 诱导的细胞凋亡过程中可被 caspase-8 在 Asp32 位点剪切^[22,23]。剪切之后，RIP1 的 C 末端不能激活 NF- κ B，从而进一步加强细胞凋亡^[23]。RIP3 也存在类似机制。在 TNF 诱导因子作用下，RIP3 会在 Asp328 出被 caspase-8 剪切。剪切后的 C 末端虽然缺乏激酶活性区，但能诱导 caspase 依赖的细胞凋亡。不同之处在于，RIP3C 末端表现出比全长 RIP3 更强的 NF- κ B 激活能力^[24]。因此 RIP3 被剪切被认为是细胞自我保护的反馈机制。

虽然 RIP3 过量表达会导致 caspase 依赖的细胞凋亡已经很确定，但 RIP3 参与哪条死亡途径以及它在信号通路中确切的定位人们还不了解。Kasof GM 等人指出，HeLa 细胞中过表达 RIP3 会诱导细胞凋亡，而 RIP3 可能位于 Bcl-2 家族成员的上游。同时他们通过使用多种 caspase 抑制剂对信号通路进行抑制，认为 caspase-2、-3、-7、-10 为此凋亡途径所必需^[14]。和 RIP1 诱导的细胞凋亡途径相比较，细胞凋亡过程中 RIP3 对 caspase-2 的依赖有相似之处，RIP1 通过 RAIDD 结合 caspase-2 而使其活化^[25, 26]。

TNF-R1 介导细胞凋亡过程中 FADD 起重要作用，但它不是 TNF 诱导凋亡的唯一途径^[27, 28]。共转染的显性负突变（dominant-negative mutant）的 FADD（DN-FADD）并不能抑制 RIP3 过量表达诱导的细胞死亡。但在 RIP3 显性负突变却一定程度抑制 TNF-R1 诱导的细胞死亡^[3]。这些实验提示 RIP3 可能位于细胞凋亡信号通路中的 FADD 下游或者另一条平行的途径。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库